

Г. И. Горбачевич, И. А. Комлач, К. В. Суббот

ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ЭКСТРАГЕНТА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ ТРУТОВИКА СЕРНО-ЖЕЛТОГО**Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск, Республика Беларусь**

В работе изучено влияние природы и состава экстрагента на содержание биологически активных веществ в экстрактах, полученных из плодовых тел трутовика серно-желтого (*Laetiporus sulphureus*) – перспективного природного сырья для использования в медицине, пищевой промышленности и косметологии. Уникальность химического состава этого гриба обусловлена полисахаридами, тритерпеноидами, стероидными и фенольными соединениями, которые обладают антиоксидантной, противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью. Целью работы является выбор оптимального состава экстрагента для эффективного выделения целевых биологически активных соединений. Установлено, что использование воды в качестве экстрагента обеспечивает максимальный выход экстрактивных веществ ($223,3 \pm 6,5$ мг/г), включающих полисахариды ($111,7 \pm 3,9$ мг/г) и фенольные соединения ($5,90 \pm 0,11$ мг/г). Для изолирования тритерпеновых и стероидных соединений наиболее эффективным растворителем оказался хлороформ ($2,68 \pm 0,26$ мг/г). В качестве универсального экстрагента рекомендована водно-этанольная смесь с содержанием 60% этанола (об/об), которая позволяет получить экстракты с высоким содержанием полисахаридов, фенольных соединений, тритерпеноидов и стероидов. Предложенный подход может быть использован для разработки экстрактивных препаратов *L. sulphureus* с широким спектром биологической активности.

Ключевые слова: трутовик серно-желтый, фенольные и тритерпеновые соединения, полисахариды.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования природного сырья грибного происхождения неуклонно возрастает в связи с растущим интересом к разработке натуральных, экологически безопасных и эффективных продуктов для медицины, пищевой промышленности и косметологии. Грибы представляют собой перспективное сырье благодаря своему уникальному химическому составу, который включает биологически активные соединения с широким спектром фармакологических свойств. К числу таких соединений относятся полисахариды, тритерпеноиды, стеролы и фенольные соединения, которые активно изучаются в контексте их антиоксидантного, противовоспалительного, противоопухолевого и иммуномодулирующего действия [1].

Особый интерес в качестве объекта исследования вызывает трутовик серно-желтый (*Laetiporus sulphureus*) – гриб из семей-

ства *Fomitopsidaceae*, который произрастает преимущественно на лиственных деревьях, таких как дуб, бук и тополь. Этот гриб широко распространен в природе (в т. ч. на территории Республики Беларусь) и с давних времен используется в традиционной медицине разных народов благодаря своим выраженным лечебным свойствам. Современные исследования подтвердили, что *L. sulphureus* обладает множеством полезных эффектов, включая противомикробное, антиоксидантное, противоопухолевое и иммуномодулирующее действие [2].

В исследованиях, посвященных поиску природных источников биологически активных веществ, одной из ключевых задач является выбор оптимального экстрагента для их выделения. Природа растворителя оказывает непосредственное влияние на эффективность извлечения целевых соединений, что, в конечном счете, определяет фармакологическую активность полученных экстрактов [3].

Кроме того, корректный выбор экстрагента позволяет обеспечить чистоту и, как следствие, высокую стабильность и эффективность полученного продукта, что играет решающую роль при разработке лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище.

Целью данного исследования является обоснование выбора оптимального экстрагента для выделения биологически активных соединений из плодовых тел *L. sulphureus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плодовые тела трутовика серно-желтого были заготовлены в июле-октябре 2024 г. в Гродненской области Республики Беларусь. Сырье сушили в сушильном шкафу (Витязь) при температуре 40 ± 2 °С, предварительно разделив на куски 2–3 см.

Для экстракции использовали измельченное в молотковой мельнице (MOLOT, диаметр отверстий сита – 2 мм) сырье и органические растворители: петролейный эфир (ПЭ, х.ч.), этилацетат (ЭА, х.ч.), хлороформ (Хл, х.ч.), этиловый спирт (EtOH) различных концентраций и воду. Экстракцию проводили путем мацерации: к 0,200 г (в пересчете на высушенное сырье [4]) измельченного сырья добавляли 10,0 мл необходимого растворителя и оставляли настаиваться в течение 7 суток при периодическом перемешивании. После настаивания извлечение процеживали, а затем фильтровали через мембранный фильтр 0,45 мкм.

Выход экстрактивных веществ (ЭВ) определяли гравиметрически путем высушивания 5,00 мл извлечений в бюксах до постоянной массы [4]. Их содержание в сырье (мг/г) рассчитывали по формуле (1):

$$\text{ЭВ} = \frac{m_{\text{ЭВ}}}{m_{\text{сырья}}} \frac{V_0}{V_1} \times 1000, \quad (1)$$

где $m_{\text{ЭВ}}$ – масса экстрактивных веществ, г;

$m_{\text{сырья}}$ – масса сырья, г;

V_0 – объем растворителя, взятый для экстракции;

V_1 – объем извлечения для анализа.

Сумму водорастворимых полисахаридов (СВП) в экстрактах также определяли гравиметрически [4]. Сухой остаток, полу-

ченный при определении выхода экстрактивных веществ, растворяли в 1,0 мл воды, после чего к раствору добавляли 4,0 мл этанола 96% (об/об). Раствор выдерживали в холодильнике в течение часа, после чего фильтровали через предварительно взвешенный фильтр «Синяя лента». Фильтр высушивали в сушильном шкафу, после чего определяли его массу. СВП (мг/г) рассчитывали по уравнению (2):

$$\text{СВП} = \frac{m_{\text{ВП}}}{m_{\text{сырья}}} \frac{V_0}{V_1} \times 1000, \quad (2)$$

где $m_{\text{ВП}}$ – разница масс фильтра до и после отделения водорастворимых полисахаридов, г.

Для определения суммы фенольных соединений (СФ) применяли фотометрический метод [5]. В пробирки отбирали по 100 мкл извлечений, добавляли 100 мкл раствора Фолина-Чокальтеу (Merck, кат. № 109001), 400 мкл 10% раствора Na_2CO_3 (ч.д.а., ЗАО «Пять океанов»), 1500 мкл воды очищенной и оставляли растворы на 60 мин при комнатной температуре в темном месте. Для построения градуировочного графика готовили серию растворов галловой кислоты в диапазоне концентраций 15,625–500 мкг/мл. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре HALO VIS-20 (Dynamica Scientific Ltd.) в кварцевой кювете (длина оптического пути 1 см) при длине волны 725 нм. СФ выражали в мг/г в пересчете на галловую кислоту, проводя расчеты по формуле (3):

$$\text{СФ} = \frac{C_{\text{ГК}} V_0}{1000 \cdot m_{\text{сырья}}}, \quad (3)$$

где $C_{\text{ГК}}$ – концентрация фенольных соединений в испытуемых растворах в пересчете на галловую кислоту (мкг/мл).

Определение суммы стероидных и три-терпеновых соединений (ССТ) в образцах экстрактов проводили спектрофотометрическим методом по реакции Либермана-Бурхардта [6]. 0,50 мл извлечения упаривали досуха, а остаток растворяли в 1,20 мл хлороформа. К 1,00 мл раствора добавляли 1,00 мл реактива Либермана-Бурхардта (уксусный ангидрид : серная кислота 10 : 1, об/об, х.ч., Экос-1), перемешивали и вы-

держивали при комнатной температуре в течение 90 мин, после чего проводили измерение оптической плотности растворов при длине волны 665 нм. Градуировочный график строили с использованием серии хлороформных растворов холестерина (Merck) с концентрацией 10–1000 мкг/мл. ССТ выражали в мг/г в пересчете на холестерин и вычисляли по формуле (4):

$$\text{ССТ} = \frac{C_x V_1 \cdot 1,2}{1000 \cdot m_{\text{сырья}}}, \quad (4)$$

где C_x – концентрация стероидных и тритерпеновых соединений в испытуемых растворах в пересчете на холестерин (мкг/мл).

1,2 – коэффициент пересчета, учитывающий взятую для анализа аликвоту.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы MS Excel 2019.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Максимальный выход экстрактивных веществ характерен для водных извлече-

ний плодовых тел *L. sulphureus* ($223,3 \pm 6,5$ мг/г, рисунок 1). Примечательно, что при этом существенная часть сухого остатка ($111,7 \pm 3,9$ мг/г, рисунок 1) приходится на водорастворимые полисахариды, представляющие интерес для фармацевтической разработки. Например, сульфатированные полисахариды *L. sulphureus* проявляют выраженную цитотоксичность в отношении клеток рака молочной железы (линии MDA-MB-231) [7], а β -глюкан ламинаран демонстрирует иммуномодулирующие свойства [8]. Кроме того, полисахариды трутовика серно-желтого показали выраженную гипогликемическую активность в модели стрептозоцин-индуцированного диабета у крыс [9].

В водных извлечениях *L. sulphureus* содержится наибольшее количество фенольных соединений ($5,90 \pm 0,11$ мг/г в пересчете на галловую кислоту, рисунок 1), представленных инаозидом А, кверцетином, кемпферолом, (+)-катехином, *п*-кумаровой, галловой, кофейной и хлорогеновыми кислотами [10, 11] – соединениями, определяющими антиоксидантную активность гриба.

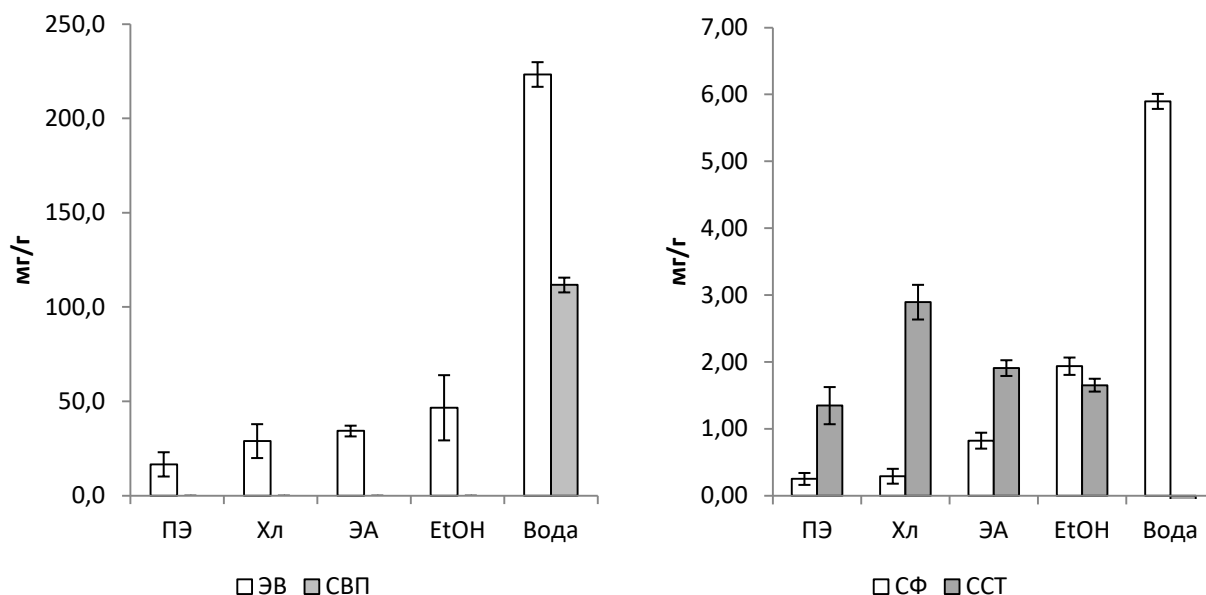


Рисунок 1. – Влияние природы экстрагента на содержание экстрактивных веществ, водорастворимых полисахаридов, фенолов, а также стероидных и тритерпеновых соединений в извлечениях *L. sulphureus*

Органические растворители (этанол, этилацетат, хлороформ и петролейный эфир) позволяют получить извлечения с суммарным содержанием экстрактивных

веществ 16,7–46,7 мг/г (рисунок 1), в которых, в отличие от водных извлечений, практически отсутствуют полисахариды, но содержатся тритерпеновые и стеро-

идные ($1,08\text{--}2,68$ мг/г в пересчете на холестерин), а также фенольные ($0,25\text{--}1,93$ мг/г) соединения (рисунок 1). При этом максимального содержания тритерпеноидов и стероидов можно достичь, используя для экстракции хлороформ ($2,68 \pm 0,26$ мг/г), а фенолов – этанол ($1,94 \pm 0,13$ мг/г). Тритерпеновая фракция плодовых тел *L. sulphureus* представлена эбуриковой, траметеноловой, сульфуреновой кислотами и их производными, которые проявляют противовоспалительную [12] и антипро-

лиферативную [13] активность широкого спектра.

Принимая во внимание предварительные данные о влиянии природы растворителя на содержание отдельных групп БАВ в экстрактах плодовых тел *L. sulphureus*, а также высокую экстрагирующую способность воды и этилового спирта для БАВ из этого сырья, было изучено влияние концентрации этанола в водно-спиртовой смеси на количественный состав и выход экстрактов (рисунок 2).

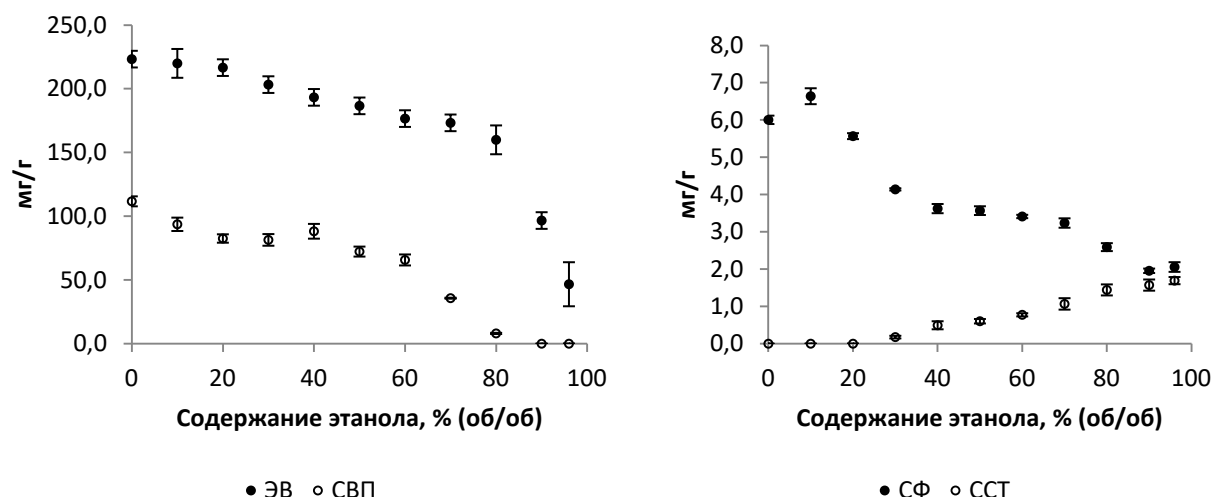


Рисунок 2. – Влияние концентрации этанола в водно-спиртовой смеси на содержание экстрактивных веществ, водорастворимых полисахаридов, фенолов, а также стероидных и тритерпеновых соединений в извлечениях *L. sulphureus*

Показано, что с ростом концентрации этанола выход экстрактивных веществ снижается соразмерно с содержанием полисахаридов в экстрактах. В целом также отмечается снижение содержания фенольных соединений в полученных извлечениях. Однако для тритерпеновых и стероидных соединений наблюдается противоположная тенденция: их содержание в извлечениях увеличивается при использовании экстрагента с высоким содержанием этанола. Важно отметить, что в извлечениях, содержащих 40–60% этанола, сумма фенольных соединений ($3,45\text{--}3,67$ мг/г) и полисахаридов ($65,73\text{--}88,2$ мг/г) изменяется незначительно, в то время как при переходе к 60%-ому содержанию этанола в экстрагенте содержание тритерпеноидов и стероидов увеличивается в 1,6 раза, что дает возможность использовать этот состав в качестве универсального экстрагента, позволяющего одновременно выделить из сырья широкий спектр биологически активных веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, максимальный выход экстрактивных веществ ($223,3 \pm 6,5$ мг/г) из плодовых тел трутовика серно-желтого наблюдается в водных извлечениях, при этом в них содержится наибольшее количество водорастворимых полисахаридов ($111,7 \pm 3,9$ мг/г) и фенольных соединений ($5,90 \pm 0,11$ мг/г). Показано, что наилучшим экстрагентом для тритерпеновых и стероидных соединений служит хлороформ ($2,68 \pm 0,26$ мг/г). В качестве универсального экстрагента, позволяющего получить продукт с высоким выходом экстрактивных веществ ($176,7 \pm 6,5$ мг/г) и содержанием полисахаридов ($65,73 \pm 4,3$ мг/г), фенолов ($3,45 \pm 0,04$ мг/г), тритерпеновых и стероидных соединений ($0,77 \pm 0,04$ мг/г), целесообразно предложить водно-этанольную смесь с содержанием этанола 60% (об/об). С учетом экономической доступности и низкой токсично-

сти этот растворитель может быть использован для получения экстрактивных препаратов трутовика серно-желтого с широким спектром биологической активности.

SUMMARY

H. I. Harbatsevich,
I. A. Komlach, K. V. Subbot
JUSTIFICATION OF THE EXTRACTANT
CHOICE OF BIOLOGICALLY ACTIVE
COMPOUNDS FROM *LAETIPORUS*
SULPHUREUS TOUCHWOOD

The effect of the extractant nature and composition on the of biologically active substances content in extracts obtained from the fruit bodies of *Laetiporus sulphureus* – promising natural raw material to be used in medicine, food industry and cosmetology has been studied in this work. The uniqueness of the chemical composition of this fungus is due to polysaccharides, triterpenoids, steroid and phenolic compounds that have antioxidant, antitumor and immunomodulatory activity. The aim of the work is to select optimal composition of the extractant for effective release of targeted biologically active compounds. It was stated that the use of water as an extractant provides maximum yield of extractive substances ($223.3 \pm \text{mg/g}$) including polysaccharides ($111.70 \pm 3.9 \text{ mg/g}$) and phenolic compounds ($5.90 \pm 0.11 \text{ mg/g}$). Chloroform ($2.68 \pm 0.26 \text{ mg/g}$) was the most effective solvent for isolating triterpene and steroid compounds. Water and ethanol mixture containing 60% ethanol (v/v) was recommended as a universal extractant which allows obtaining extracts with a high content of polysaccharides, phenolic compounds, triterpenoids and steroids. The proposed approach can be used to develop extractive preparations of *L. sulphureus* with a wide range of biological activity.

Keywords: *Laetiporus sulphureus*, phenolic and triterpene compounds, polysaccharides.

ЛИТЕРАТУРА

1. European medicinal polypores – a modern view on traditional uses / U. Grienke, M. Zöll, U. Peintner, J. M. Rollinger // J. of ethnopharmacology. – 2014. – Vol. 154, N 3. – P. 564–583.

2. *Laetiporus sulphureus* – chemical composition and medicinal value / K. Ziaja, B. Muszyńska, A. Gawalska, K. Sałaciak // Acta Scientiarum Polonorum: Hortorum Cultus. –

2018. – Vol. 17, N 1. – P. 87–96.

3. Extraction and utilization of active substances from edible fungi substrate and residue: A review / P. Qin, T. Li, C. Liu [et al.] // Food chemistry. – 2023. – Vol. 398. – P. 133872–133883.

4. Государственная фармакопея Республики Беларусь: в 2 т.: введ. в действие с 1 янв. 2013 г. приказом М-ва здравоохранения Респ. Беларусь от 25.04.2012 г. № 453. – Т. 1: Общие методы контроля качества лекарственных средств / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении; [под общ. ред. А. А. Шерякова]. – Молодечно: Победа, 2012. – 1220 с.

5. Singleton, V. L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent / V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventós // Methods in enzymology. – 1999. – Vol. 299. – P. 152–178.

6. Nath, M. Liebermann-Burchard Reaction for Steroids / M. Nath, M. Chakravorty, S. Chowdhury // Nature. – 1946. – Vol. 157. – P. 103–104.

7. Sulfated polysaccharides of *Laetiporus sulphureus* fruiting bodies exhibit anti-breast cancer activity through cell cycle arrest, apoptosis induction, and inhibiting cell migration / C. I. Jen, M. K. Lu, M. N. Lai, L. T. Ng // J. of ethnopharmacology. – 2024. – Vol. 321. – P. 117546–117557.

8. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* / G. Alquini, E. R. Carbonero, F. R. Rosado [et al.] // FEMS microbiology letters. – 2024. – Vol. 230, N 1. – P. 47–52.

9. Hwang, H. S. Hypoglycemic effect of polysaccharides produced by submerged mycelial culture of *Laetiporus sulphureus* on streptozotocin-induced diabetic rats / H. S. Hwang, J. W. Yun // Biotechnology and bioprocess engineering. – 2010. – Vol. 15. – P. 173–181.

10. Inaoside A: New antioxidant phenolic compound from the edible mushroom *Laetiporus cremeriporus* / A. Kawamura, A. Mizuno, M. Kurakake [et al.] // Heliyon. – 2024. – Vol. 10, N 3. – P. e24651–e24659.

11. Olennikov, D. N. Antioxidant components of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. fruit bodies / D. N. Olennikov, L. M. Tankhaeva, S. V. Agafonova // Applied biochemistry and microbiology. – 2011. – Vol. 47. – P. 419–425.

12. New Triterpenoids from the Fruiting Bodies of *Laetiporus sulphureus* and Their Anti-Inflammatory Activity / Q. Khalilov, S. Numonov, P. Sukhrov [et al.] // ACS omega. – 2022. – Vol. 7, N 31. – P. 27272–27277.

13. Hassan, K. Two New Triterpenes from Basidiomata of the Medicinal and Edible Mushroom, *Laetiporus sulphureus* / K. Hassan, B. Kemkuguonou, M. Stadler // Molecules (Basel, Switzerland). – 2021. – Vol. 26, N 23. – P. 7090–7095.

REFERENCES

- Grienke U, ZöllM, Peintner U, Rollinger JM. European medicinal polypores – a modern view on traditional uses. J Ethnopharmacol. 2014;154(3):564–83. doi: 10.1016/j.jep.2014.04.030
- Ziaja K, Muszyńska B, Gawalska A, Sałaciak K. *Laetiporus sulphureus* – chemical composition and medicinal value. Acta Scientiarum Polonorum: Hortorum Cultus. 2018;17(1):87–96. doi: 10.24326/asphc.2018.1.8
- Qin P, Li T, Liu C, Liang Y, Sun H, Chai Y et al. Extraction and utilization of active substances from edible fungi substrate and residue: A review. Food Chem. 2023;398:133872–83. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133872
- Ministerstwo zdrowookhraneniia Respubliki Belarus', Tsentru ekspertiz i ispytaniia v zdrowookhraneniia. State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus: v 2 t. T. 1, General methods of quality control of medicines. Sheriakov AA, redactor. Molodechno, RB: Pobeda; 2012. 1220 s. (In Russ.)
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 1999;299:152–78. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1
- Nath M, Chakravorty M, Chowdhury S. Liebermann-Burchard Reaction for Steroids. Nature. 1946;157:103–4. doi: 10.1038/157103b0
- Jen CI, Lu MK, Lai MN, Ng LT. Sulfated polysaccharides of *Laetiporus sulphureus* fruiting bodies exhibit anti-breast cancer activity through cell cycle arrest, apoptosis induction, and inhibiting cell migration. J Ethnopharmacol. 2024;321:117546–57. doi: 10.1016/j.jep.2023.117546
- Alquini G, Carbonero ER, Rosado FR, Cosentino C, Iacomini M. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus*. FEMS Microbiol Lett. 2024;230(1):47–52. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00853-X
- Hwang HS, Yun JW. Hypoglycemic effect of polysaccharides produced by submerged mycelial culture of *Laetiporus sulphureus* on streptozotocin-induced diabetic rats. Biotechnol Bioprocess Eng. 2010;15:173–81. doi: 10.1007/s12257-009-0160-6
- Kawamura A, Mizuno A, Kurakake M, Yamada A, Makabe H. Inaoside A: New antioxidant phenolic compound from the edible mushroom *Laetiporus cremeiporus*. Heliyon. 2024;10(3):e24651–59. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e24651
- Olennikov DN, Tankhaeva LM, Agafonova SV. Antioxidant components of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. fruit bodies. Appl Biochem Microbiol. 2011;47:419–25. doi: 10.1134/S0003683811040107
- Khalilov Q, Numonov S, Sukhrobov P, Bobakulov K, Sharopov F, Habasi M et al. New Triterpenoids from the Fruiting Bodies of *Laetiporus sulphureus* and Their Anti-Inflammatory Activity. ACS Omega. 2022;7(31):27272–77. doi: 10.1021/acsomega.2c02165
- Hassan K, Kemkuignou B, Stadler M. Two New Triterpenes from Basidiomata of the Medicinal and Edible Mushroom, *Laetiporus sulphureus*. Molecules. 2021;26(23):7090–95. doi: 10.3390/molecules26237090

Адрес для корреспонденции:

220116, Республика Беларусь,
г. Минск, пр. Дзержинского, 83,
УО «Белорусский государственный
медицинский университет»,
кафедра фармацевтической химии
с курсом повышения квалификации
и переподготовки,
тел. +375293487366,
e-mail: hleb.harbatsevich@gmail.com,
Горбачевич Г. И.

Поступила 16.09.2024 г.